

*Anna Bernardi
Dipartimento di Chimica
Università di Milano
anna.bernardi@unimi.it*

PROGETTAZIONE E SINTESI DI GLICOMIMETICI

Le interazioni carboidrato-proteina sono determinanti nelle fasi iniziali dei processi di infiammazione e di infezione. La presentazione discute due casi in cui molecole glicomimetiche, interferendo con l'azione dei recettori DC-SIGN e MBL, hanno un effetto protettivo nelle infezioni da HIV e nell'ictus cerebrale.

I carboidrati sono di gran lunga i più abbondanti prodotti naturali. Non solo costituiscono una fonte importante di energia metabolica, ma sono anche ampiamente espressi come glicoconjugati sulla superficie delle cellule, dove giocano un ruolo chiave in processi biologici fondamentali [1-3].

Questo ruolo è stato apprezzato in modo crescente negli ultimi due decenni grazie ai risultati della glicobiologia: è ormai chiaro che i glicani codificano nella loro struttura importanti informazioni biochimiche che vengono "lette" da appositi recettori proteici, noti collettivamente sotto il nome di *lectine* [4]. In questo contesto, la sintesi di molecole glicomimetiche che possono interferire con la formazione di complessi zucchero-proteina può fornire importanti strumenti per

lo studio di processi biologici e generare nuove idee per la medicinal chemistry [5].

Finora, la maggior parte di questo lavoro è stato diretto verso gli enzimi, glicosidasi e glicosiltransferasi, che determinano la biosintesi e il metabolismo dei glicani [6-8]. Meno è noto riguardo all'inibizione del riconoscimento zuccheri/lectine. Si definiscono *lectine* quei recettori proteici che riconoscono carboidrati con elevata specificità, ma mancano di attività enzimatica sui loro ligandi. Esse sono implicate nei processi di riconoscimento cellula-cellula, nell'interazione tra cellule e matrice extracellulare, nella fecondazione dei gameti, nello sviluppo embrionale, nella crescita e differenziazione cellulare, nell'adesione cellulare, nella migrazione, nell'apoptosi, nell'immu-

Relazione presentata alla giornata "Incontro con l'Università, il CNR e l'Industria - VIII Edizione". Milano, 28 febbraio 2013.



Lectine di tipo C nel sistema immunitario

- Le lectine tipo C sono recettori Ca-dipendenti che riconoscono carboidrati
- Possono essere circolanti o espresse sulla superficie di specifiche cellule
- Nel sistema immunitario funzionano come sensori degli agenti patogeni, legandosi ai pathogen-associated molecular patterns (PAMPS)

Lectina	Specificità
MBL attiva il pathway delle lectine (risposta immunitaria innata) Ruolo nel danno da riperfusione dopo ictus cerebrale (ref 24)	Man, ManNAc
Langerin Azione protettiva nell'infezione da HIV	Man, Siax
DC-SIGN Promuove l'infezione da HIV, Ebola e Dengue	Man, Le(Fuc)

Fig. 1 - Lectine di tipo C

nomodulazione e nell'infiammazione. Le lectine controllano anche gli stadi iniziali di molte infezioni (interazioni ospite-patogeno), nonché il folding e il routing delle glicoproteine [9]. Pertanto, in linea di principio, le lectine possono evidentemente essere considerate come potenziali targets terapeutici [5a, 10, 11], ma sono state raramente sfruttate come tali. In effetti, i carboidrati come classe di molecole sono stati per lo più trascurati dalla medicinal chemistry. Alcuni casi di successo sono noti, ad esempio l'inibizione di α -glicosidasi con acarbose o voglibose per il trattamento del diabete di tipo 2 [12], l'inibizione della neuraminidasi virale nel trattamento dell'influenza (Relenza, Zanamivir) [7], l'inibizione dell'adesione virale all'epitelio [13]. Tuttavia, l'alta densità di gruppi funzionali e l'immensa varietà strutturale dei glicani complessi rappresentano una grande sfida per lo sviluppo di antagonisti innaturali, mentre i carboidrati stessi sono troppo idrofili per avere buona biodisponibilità. A queste difficoltà si aggiunge il fatto che il riconoscimento zuccheri/lectine è intrinsecamente un processo a bassa affinità.

Tipicamente, le lectine possiedono siti di binding ampi e poco profondi, esposti al solvente sulla superficie della proteina e quindi dotati di bassa affinità per i singoli oligosaccaridi. Ciò non toglie che le lectine possano raggiungere livelli molto alti di specificità e anche di affinità, che vengono generalmente raggiunti attraverso il principio della multivalenza, che aumenta l'avidità dell'interazione [14].

Un ulteriore limite all'applicazione dei carboidrati come farmaci è la labilità dei legami glicosidici all'azione degli enzimi idrolitici (glicosidasi) *in vivo*. Questo può essere aggirato sviluppando nuovi composti glicomimetici, dotati di stabilità chimica e metabolica, ma capaci di mimare l'attività biologica di specifici oligosaccaridi. I progressi nello sviluppo di mimici di oligosaccaridi sono stati oggetto di varie rassegne bibliografiche [5, 10, 11]. Ulteriori esempi recenti includono lo sviluppo di antagonisti delle selectine [18], della tossina colerica [16], inibitori dell'adesione di *E. coli* uropatogenica mediata da FimH [17], MAG antagonisti e altri leganti delle Siglec [18], C-glicosidi come leganti della lectina PA-IL di *Pseudomonas aeruginosa*, implicata nella formazione e stabilizzazione del biofilm [19].

Negli ultimi anni molta della nostra attività si è indirizzata verso progettazione, sintesi e caratterizzazione di antagonisti monovalenti e polivalenti della lectina DC-SIGN (dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing non integrin) [20], implicata in vari processi di infezione virale, e della lectina MBL (Mannose Binding Lectin), coinvolta nell'attivazione del complemento (risposta immunitaria innata) [21]. Ambedue queste proteine appartengono alla famiglia delle lectine di tipo C e presentano una comune specificità per il mannosio (Fig. 1).

Fig. 2 - I glicomimetici 1 e 2 e la loro presentazione multivalente su dendroni e dendrimeri tipo Boltorn

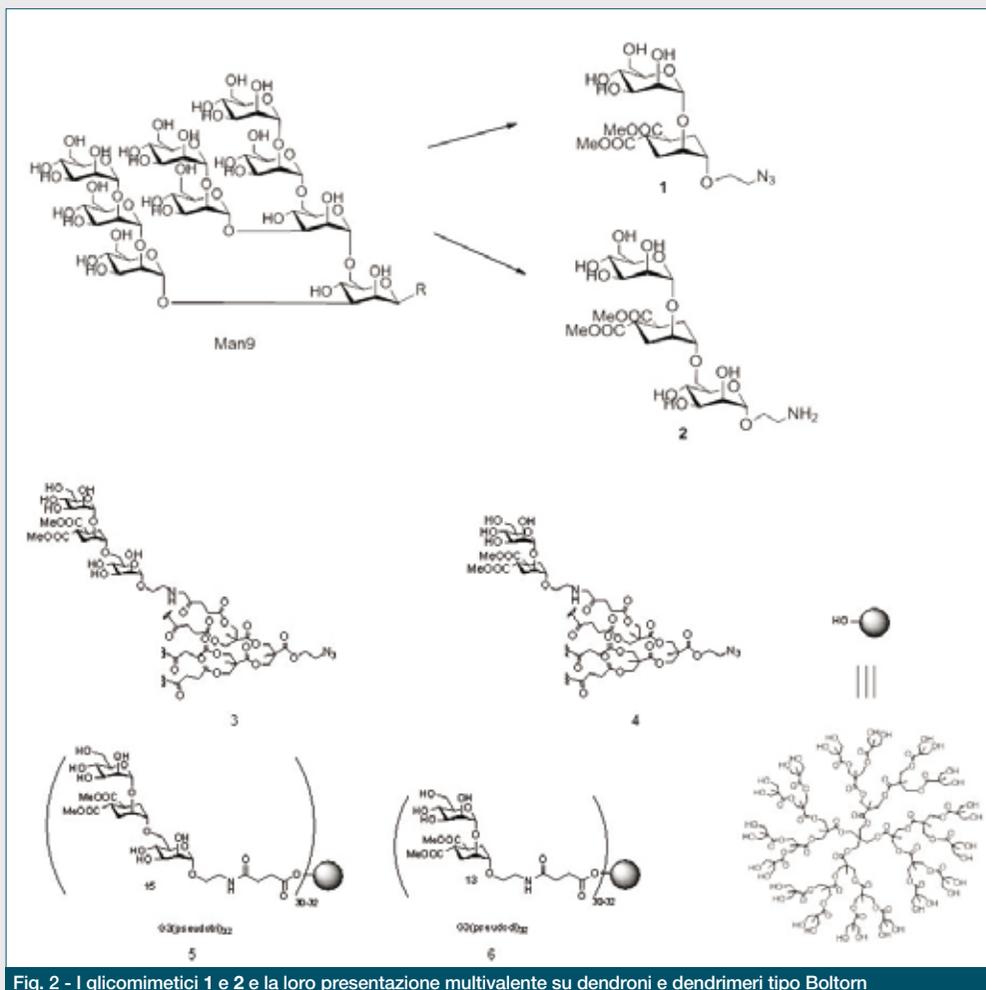


Fig. 2 - I glicomimetici 1 e 2 e la loro presentazione multivalente su dendroni e dendrimeri tipo Boltorn

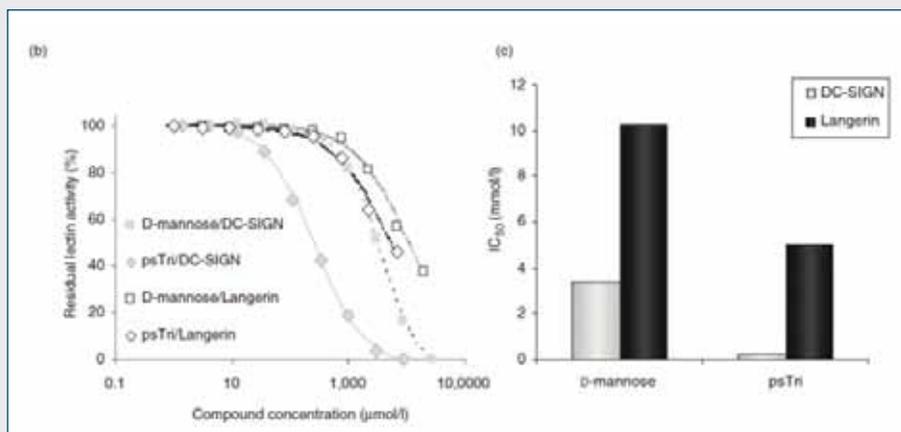


Fig. 3 - Pannello di sinistra: inibizione del binding di DC-SIGN o Langerin ad una superficie destrano/Man-BSA (Risonanza Plasmonica di Superficie, SPR) da parte di D-mannosio o di **2** (psTri); pannello di destra: istogrammi di selettività

DC-SIGN è una C-lectina di transmembrana di tipo II, presente come tetramero sulla membrana della cellule dendritiche. Questa struttura consente la presentazione simultanea di quattro domini di riconoscimento dei carboidrati (CRD) [22], che vengono impiegati dalla cellula dendritica per riconoscere e legare glicconiugati specifici alla superficie di diversi agenti patogeni, tra cui virus (HIV, Ebola, Citomegalovirus, Dengue, Sars) [20, 23], batteri (*M. tuberculosis*, *S. pneumoniae*) [24], funghi (*C. albicans*, *A. fumigatus*) [25] e parassiti (*Leishmania*, *S. mansoni*) [26]. Normalmente, questa azione ha una funzione protettiva per l'organismo: il patogeno riconosciuto viene internalizzato nella cellula dendritica e degradato nei compartimenti lisosomiali, generando così i frammenti antigenici che danno origine, attraverso un meccanismo complesso, alla risposta anticorpale. Nel 2000 il gruppo di van Kooyk ha riportato che HIV sovverte questa normale funzione, in quanto esso viene riconosciuto da DC-SIGN, ma sfugge alla degradazione.

La trasmissione sessuale dell'infezione, quindi, avviene a livello delle mucose (vaginali o anali) dove le cellule dendritiche si caricano di virus e vengono utilizzate come un cavallo di Troia per invadere l'ospite [20]. Per questo bloccare l'interazione tra virus e DC-SIGN con antagonisti sviluppati per uso topico è una possibile strategia per inibire la trasmissione sessuale dell'infezione virale [27, 5].

Il principale glicano riconosciuto da DC-SIGN è il cosiddetto "high mannose", o Man9 (Fig. 2), un oligosaccaride ramificato presentato in copie multiple da gp120, la proteina di envelope di HIV. DC-SIGN può anche riconoscere strutture ramificate fucosilate recanti residui di galattosio terminali, come ad esempio gli antigeni Lewis. L'interazione primaria tra oligosaccaridi e DC-SIGN avviene per coordinazione di uno dei residui dello zucchero ad uno ione Ca^{2+} esposto alla superficie della proteina [28].

Usando Man9 come template, abbiamo progettato i due leganti psDi (**1**) e psTri (**2**) (Fig. 2), mimici rispettivamente di un di- e di un trimannoside e corrispondenti alle estremità terminali di Man9 e abbiamo studiato la loro interazione con la proteina [29]. I risultati più interessanti sono stati ottenuti con i costrutti multivalenti **3-6** (Fig. 2),

in cui **1** e **2** sono stati coniugati a supporti polivalenti (dendrimeri o dendroni) sintetizzati a partire da acido bis-idrossimetilpropionico.

I risultati raccolti in Fig. 3 mostrano che psTri (**2**) lega DC-SIGN con un'affinità superiore di un ordine di grandezza a quella del mannosio. Questa molecola, inoltre, a differenza del mannosio, si lega selettivamente a DC-SIGN e non interagisce con Langerin (Fig. 1), una seconda lectina del sistema immunitario che ha un'azione protettiva contro le infezioni da HIV. Nella presentazione tetravalente **3** psTri inibisce l'infezione da HIV sia in un modello cellulare che in espianti di tessuto cervicale a concentrazioni micromolari [29b, 30]. Attività anche superiori sono state osservate in un modello di infezione di Ebola:

in particolare i dendrimeri **5** e **6** a valenza 32 sono attivi con IC_{50} circa 20 nM [31].

Per certi versi, la selettività contro Langerin di **2** e dei suoi derivati è la caratteristica più interessante di questa molecola, molto promettente per reali applicazioni biomediche. Il nostro lavoro di ottimizzazione, svolto nell'ambito della rete europea Carmusys (www.carmusys.iiq.csic.es/) sta proseguendo nella direzione di semplificarne la complessità strutturale e sintetica, con interessanti risultati [32].

Nell'ambito dei nostri studi sulla selettività di **2** e **3** abbiamo compiuto recentemente un'altra interessante osservazione: queste due molecole, infatti, interagiscono con buona affinità anche con MBL. MBL è una proteina del siero che agisce come recettore dei cosiddetti PAMPs, Pathogen Associated Molecular Patterns, e DAMPs, Damage Associated Molecular Patterns, cioè carboidrati esposti rispettivamente alla superficie di patogeni o di cellule morenti o danneggiate. Il legame di MBL ai suoi target cellulari porta all'attivazione del complemento, una parte del sistema immunitario innato, la cui cascata conduce all'attivazione di un potente sistema di distruzione cellulare [21].

Dati recenti, ottenuti presso l'Istituto Farmacologico Mario Negri di Milano, suggeriscono fortemente che MBL svolga un ruolo importante nel danno cerebrale da ripercussione che si osserva in seguito ad un evento ischemico [33].

In collaborazione con il gruppo del Mario Negri abbiamo testato l'attività di **3** (Polyman2) in un modello di ischemia cerebrale nel topo e osservato che questo dendrone, intercettando MBL circolante, riesce a ridurre il danno del tessuto cerebrale. I risultati, pubblicati recentemente nella prestigiosa rivista *Circulation*, mostrano che Polyman2 ha un effetto protettivo anche se somministrato diverse ore dopo l'evento ischemico, il che costituisce un grande vantaggio rispetto alle terapie attualmente disponibili [34].

Globalmente i nostri risultati mostrano che è possibile interferire selettivamente con il riconoscimento carboidrati/proteine usando semplici mimici di oligosaccaridi e che questi antagonisti possono avere applicazioni terapeutiche importanti.

Bibliografia

- [1] J.P. Kamerling, *Comprehensive Glycoscience. From Chemistry to System Biology*, Vol. 3, 4, Elsevier, Amsterdam, 2007.
- [2] a) H.-J. Gabius *et al.*, *Trends in Biochemical Sciences*, 2011, **36**, 298; b) H.J. Gabius *et al.*, *ChemBioChem*, 2004, **5**, 740.
- [3] a) Structural Medicine: The Importance of Glycomics for Health and Disease, European Science Foundation, Strasbourg, 2006; b) D.B. Werz, P.H. Seeberger in *Chemical Biology: From Small Molecules to Systems Biology and Drug Design*, S.L. Schreiber *et al.* (Eds.), Wiley-VCH, Weinheim, 2007, 668; c) K.T. Pilobello, L.K. Mahal, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2007, **11**, 300; d) J.C. Paulson *et al.*, *Nat. Chem. Biol.*, 2006, **2**, 238; e) T. Lueteteke *et al.*, *Glycobiology*, 2006, **16**, 71R.
- [4] C.R. Bertozzi, L.L. Kiessling, *Science*, 2001, **291**, 2357.
- [5] a) B. Ernst, J.L. Magnani, *Nat. Rev. Drug Discovery*, 2009, **8**, 661; b) P. Cheshev, A. Bernardi, *Chem. Eur. J.*, 2008, **14**, 7434.
- [6] a) B. Winchester, G.W.J. Fleet, *Glycobiology*, 1992, **2**, 199; b) M.S.M. Pearson *et al.*, *Eur. J. Org. Chem.*, 2005, 2159 and references therein; c) Y. Nishimura, in *Iminosugars: From Synthesis to Therapeutic Applications*, P. Compain, O.R. Martin (Eds.), Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 2007, p. 269; d) M. Aguilar-Moncayo *et al.*, *Org. Biomol. Chem.*, 2011, **9**, 3698 and references therein.
- [7] M. von Itzstein, *Nat. Rev. Drug Discovery*, 2007, **6**, 967.
- [8] B.J. Gross *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, **130**, 440.
- [9] a) H. Ghazarian *et al.*, *Acta Histochemica*, 2011, **113**, 236; b) W.I. Weis *et al.*, *Immun. Rev.*, 1998, **163**, 19; c) H.J. Gabius *et al.*, *Biochem. Biophys. Acta*, 2002, **1572**, 165; d) R.J. Pieters, *ChemBioChem*, 2006, **7**, 721; f) N. Sharon, H. Lis, *Glycobiology*, 2004, **14**, 53R; e) H. Sanchez-Ruderisch *et al.*, *FEBS J.*, 2010, **277**, 3552.
- [10] L. Cipolla *et al.*, *Expert. Opin. Drug Discov.*, 2010, **5**, 1; L. Cipolla *et al.*, *Fut. Med. Chem.*, 2010, **2**, 587.
- [11] J.J. Reina, A. Bernardi, *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 2012, **12**, 1434.
- [12] a) A. Varki, *Glycobiology*, 1993, **3**, 97; b) R.A. Dwek, *Chem. Rev.*, 1996, **96**, 683; c) Y.C. Lee, R.T. Lee, *Acc. Chem. Res.*, 1995, **28**, 321; d) P.H. Seeberger, D.B. Werz, *Nature*, 2007, **446**, 1046.
- [13] K. Aplander *et al.*, *J. Med. Chem.*, 2011, **54**, 8627.
- [14] C. Fasting *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2012, **51**, 10472.
- [15] F.P.C. Binder, B. Ernst, *Chimia*, 2011, **65**, 210.
- [16] a) P. Cheshev *et al.*, *Chemistry Eur. J.*, 2010, **16**, 1951; b) H.-A. Tran *et al.*, *Org. Biomol. Chem.*, 2011, **9**, 3658.
- [17] a) T. Klein *et al.*, *J. Med. Chem.*, 2010, **53**, 6670; b) O. Schwardt *et al.*, *Bioorg. Med. Chem.*, 2011, **19**, 6454; c) M. Hartmann, T.K. Lindhorst, *Eur. J. Org. Chem.*, 2011, 3583 and references therein.
- [18] a) S. Mesch *et al.*, *ChemMedChem*, 2012, **7**, 134; b) Y. Zeng *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2011, **21**, 5045; c) O. Schwardt *et al.*, *Bioorg. Med. Chem.*, 2010, **18**, 7239.
- [19] Y.M. Chambre *et al.*, *Chem. Eur. J.*, 2011, **17**, 6545.
- [20] T.B.H. Geijtenbeek *et al.*, *Cell*, 2000, **100**, 575.
- [21] W.K. Ip *et al.*, *Immunol. Rev.*, 2009, **230**, 9.
- [22] a) G. Tabarani *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 2009, **284**, 21229; b) D. Serrano-Sierra-Gomez *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 2008, **283**, 3889; c) H. Feinberg *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 2005, **280**, 1327; d) D.A. Mitchell *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 2001, **276**, 28939.
- [23] a) P.-Y. Lozach *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 2003, **278**, 20358; b) C.P. Alvarez *et al.*, *J. Virol.*, 2002, **76**, 6841; c) D.P. Han *et al.*, *J. Virol.*, 2007, **81**, 12029.
- [24] a) L. Tailleux *et al.*, *J. Exp. Med.*, 2003, **197**, 121; b) Y.S. Kang *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2004, **101**, 215.
- [25] a) A. Cambi *et al.*, *Eur. J. Immunol.*, 2003, **33**, 532; b) D. Serrano-Gomez *et al.*, *J. Immunol.*, 2004, **173**, 5635.
- [26] a) M. Colmenares *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 2002, **277**, 36766; b) I. van Die *et al.*, *Glycobiology*, 2003, **13**, 471.
- [27] a) J.J. Reina *et al.*, *Fut. Med. Chem.*, 2010, **2**, 1141 and references cited therein; b) M. Sánchez-Navarro, J. Rojo, *Drugs News & Perspectives*, 2010, **23**, 557.
- [28] a) H. Feinberg *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 2007, **282**, 4202; b) Y. Guo *et al.*, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2004, **11**, 591; c) H. Feinberg *et al.*, *Science*, 2001, **294**, 2163.
- [29] a) J.J.Reina *et al.*, *ChemMedChem* 2007, **2**, 1030; b) S. Sattin *et al.*, *ACS Chem. Biol.*, 2010, **5**, 301.
- [30] A. Berzi *et al.*, *AIDS*, 2012, **26**, 127.
- [31] J. Luczkowiak *et al.*, *Bioconjugate Chemistry*, 2011, **22**, 1354.
- [32] N. Varga *et al.*, *Chem. Eur. J.*, 2013, **19**, 4786.
- [33] R. Gesuete *et al.*, *Ann. Neurol.*, 2009, **66**, 332.
- [34] F. Orsini *et al.*, *Circulation*, 2012, **126**, 1484.

ABSTRACT

Design and Synthesis of Glycomimetics

Carbohydrate-protein interactions play a major role in the initial steps of infection and inflammation. The presentation showed two cases of glycomimetic molecules that exert a protective effect against HIV infection and ischemic brain damage by antagonizing two different sugar receptors (DC-SIGN and MBL).